

明細書

フィルタとそれを備えたバイオセンサ

技術分野

本発明は、化学、生化学、医学などの分野における臨床試験、特にポイントオブケア検査、または家庭などで使用する、血液成分を分離するためのフィルタおよびそのようなフィルタを備えたバイオセンサに関する。

背景技術

血液中の成分を測定する生化学検査は各種の診断、観察に広く利用され、臨床検査として重要な検査法となっている。各種の生化学検査装置が開発され多数の検体や多数の検査項目が分析されている。このような検査において、血液中の特定の成分、特に血球成分は、測定値に高いバックグラウンドを生じるか、または測定装置の性能を妨害するため、サンプル中の血球成分の除去が望まれる。また、検査装置は、多くの場合、少量のサンプル量での測定が可能であることが望ましい。

血球成分の除去は、しばしば、一般的なフィルタ材を使用して行われる。例えば、電気化学センサの血液試料導入路に一般的なフィルタ材（例えば、ガラスファイバー、セルロースなどの親水性繊維で構成される不織布、またはパルプ、濾紙など）を組み入れた、フィルタ一体型センサチップに関する技術がある（例えば、米国特許

公開第 2 0 0 2 / 0 1 4 8 7 2 6 号公報を参照)。

しかしながら、このような一般的なフィルタ材を使用したフィルタでは、相当量の血漿成分がフィルタ材に吸収されてしまうために、濾過後に残るサンプルの量がかなり減少してしまう。そのため、濾過後に十分な量のサンプルを得るには、多量の血液が必要である。

このようなフィルタ材の問題に対処するべく、少量の血液で血球成分の除去を行う装置が開発されている。例えば、米国特許第 6, 3 1 9, 7 1 9 号明細書に開示される血球成分分離構造物では、毛管現象によりサンプルを経路内に導入し、経路内部に配置した多数の欠けた月または弾丸の形をした障害物を利用して血球成分を分離している。

しかしながら、このような毛管現象と経路内部の障害物とを利用した血球成分分離構造物でも、必要な血液量に関しては、未だ改善の余地がある。現在、チップタイプの血糖センサに使用されるサンプル容量は約 0. 3 ~ 4 μ l であるが、上記米国特許第 6, 3 1 9, 7 1 9 号の血球成分分離構造物は、血液の濾過を行うために、2 0 ~ 5 0 μ l のサンプル容量を必要とする。したがって、血球を分離せずに血糖センサでの検査を行う場合に比べて、未だに多量のサンプルが必要とされる。

また、血糖センサの代表的な大きさが幅 6 m m、長さ 1 0 m m であるが、上記米国特許第 6, 3 1 9, 7 1 9 号の血球成分分離構造物では、血球移動遅延の効果で血球濾過を行っているため、流路長を長くとる必要があり、流路である毛管経路の幅が 2 ~ 5 m m、長さが 7 0 m m 程度必要

となる。そのためデバイスのサイズが大きく、チップタイプの血糖センサと一体化して使用することが困難であるという問題がある。

さらに、血液中に含まれる赤血球の割合は、5割近くにもなるが、このように分離すべき成分が全体の5割近くをも占めるという血液の性質は、血液中の血球成分の分離において、フィルタが目詰まりを起こしやすいという特有の課題を提示する。

発明の開示

本発明は、このような従来の課題を解決するものであり、必要とされるサンプル量が極力少なく、チップタイプのバイオセンサに適用し得る程度に小さなサイズの血液成分分離用フィルタ、およびそのようなフィルタと一体化したバイオセンサを提供することを目的とする。さらに、血球成分によるフィルタの目詰まりを効果的に防止するフィルタおよびそのようなフィルタと一体化したバイオセンサを提供することを目的とする。

上記目的を達成するために、本発明は、血球成分を含む血液試料を濾過するためのフィルタを提供し、このフィルタは、

上記血液試料を流すための流路と、

上記流路の一端に上記血液試料を導入するための開口部と、

上記流路の他端に濾過された上記血液試料を排出するための開口部とを備え、上記流路内には血球成分の通過を妨

げるように複数の構造物が配置されている。さらに、上記構造物の各々は、隣接する流路の内壁または隣接する他の構造物との間で血球成分が通過できないようなスリットを形成するように間隔をおいて配置され、上記複数の構造物および上記流路の内壁は、血球成分を收容するための血球溜として機能するキャビティを少なくとも1つ上記流路内に規定する。

本発明のフィルタの好ましい実施形態では、上記キャビティが、少なくとも2つ上記流路内に規定されている。

本発明のフィルタの好ましい実施形態では、上記キャビティの奥行きは、上記キャビティの開口部の幅よりも大きい。

本発明のフィルタの好ましい実施形態では、上記キャビティの開口部の幅は、約 $2\ \mu\text{m}$ ～ 約 $10\ \mu\text{m}$ の範囲である。

本発明のフィルタの好ましい実施形態では、上記キャビティの形状は、ほぼ直方体である。

本発明のフィルタの好ましい実施形態では、上記スリットの幅は、約 $0.1\ \mu\text{m}$ ～ 約 $2\ \mu\text{m}$ の範囲である。

本発明のフィルタの好ましい実施形態では、上記流路は、基板と、スペーサと、当該スペーサを介して当該基板に張り合わされるカバーとから形成される。

本発明のフィルタの好ましい実施形態では、上記構造物は、柱状の形状を有する。

本発明のフィルタのさらに好ましい実施形態では、上記構造物は、円柱状の形状を有する。

本発明のフィルタの好ましい実施形態では、上記血液試料は、毛管作用により上記流路内に導入される。

本発明のフィルタの好ましい実施形態では、上記構造物および上記流路の内壁は、シリコーン樹脂、テフロン、もしくはエポキシ樹脂で構成されているか、またはこれらのいずれかで表面が被覆されている。

本発明は、さらに別の局面において、血球成分を含む血液試料を濾過するためのフィルタ領域を備えたバイオセンサを提供する。このバイオセンサは、

基板と、

上記基板に支持された測定系と、

上記測定系またはその近傍の上記基板上に支持された酸化還元酵素を含む試薬系と、

上記基板と組み合わされるカバーであって、それにより上記基板との間に、上記血液試料から血球成分を除去するためのフィルタ領域と、上記測定系および上記試薬系を収容する反応領域と、上記フィルタ領域と連結し上記反応領域に試料を導入するための試料導入路とを規定する、カバーとを含み、

上記フィルタ領域は、

上記血液試料を流すための流路と、

上記流路の一端に上記血液試料を導入するための開口部と、

上記流路の他端に濾過された上記血液試料を排出するための開口部であって、上記試料導入路と連結した開口部と

上記流路内に血球成分の通過を妨げるように配置された複数の構造物とによって規定され、

上記構造物の各々は、隣接する流路の内壁または隣接する他の構造物との間で血球成分が通過できないようなスリットを形成するように間隔をおいて配置され、

上記複数の構造物および上記流路の内壁は、血球成分を収容するための血球溜として機能するキャビティを少なくとも1つ上記流路内に規定する。

本発明のバイオセンサの好ましい実施形態では、上記測定系に、少なくとも一对の電極を含む電極系を含む。

本発明のバイオセンサの好ましい実施形態では、上記キャビティが少なくとも2つ上記流路内に規定されている。

本発明のバイオセンサの好ましい実施形態では、上記キャビティの奥行きは、上記キャビティの開口部の幅よりも大きい。

本発明のバイオセンサの好ましい実施形態では、上記キャビティの開口部の幅は、約 $2\ \mu\text{m}$ ~ 約 $10\ \mu\text{m}$ の範囲である。

本発明のバイオセンサの好ましい実施形態では、上記キャビティの形状は、ほぼ直方体である。

本発明のバイオセンサの好ましい実施形態では、上記スリットの幅は、約 $0.1\ \mu\text{m}$ ~ 約 $2\ \mu\text{m}$ の範囲である。

本発明のバイオセンサの好ましい実施形態では、上記流路は、基板と、スペーサと、当該スペーサを介して当該基板に張り合わされるカバーとから形成される。

本発明のバイオセンサの好ましい実施形態では、上記構

造物は、柱状の形状を有する。

本発明のバイオセンサのさらに好ましい実施形態では、上記構造物は、円柱状の形状を有する。

本発明のバイオセンサの好ましい実施形態では、上記血液試料は、毛管作用により上記流路内に導入される。

本発明のバイオセンサの好ましい実施形態では、上記構造物および上記流路の内壁は、シリコーン樹脂、テフロン、もしくはエポキシ樹脂で構成されているか、またはこれらのいずれかで表面が被覆されている。

本明細書中で使用される「血球」または「血球成分」という用語は、当該分野で認識されている通常の意味で使用され、血液中の赤血球、白血球、および血小板を意味する。しかしながら、検査目的やデバイス設計における諸々の状況等に応じて、測定結果の正確性に対して特に影響を及ぼし得るものとして、主に、赤血球のみ、もしくは白血球のみ、または赤血球および白血球のみを「血球」または「血球成分」として考慮する場合もあり得る。

本明細書中で使用される「血漿」または「血漿成分」という用語は、当該分野で認識されている通常の意味で使用され、血液中の血球成分を除いた成分（主に液状成分を構成する血清およびフィブリノーゲン）のことを意味する。なお、「血球」として血小板を特に考慮しない場合には、血小板を血漿または血漿成分に含める（「血球」の他の成分についても同様）。

本発明により、微量サンプル量で、小さな形状で、短時間で血球と血漿を分離する事が可能なフィルタとそれを用

いたバイオセンサが提供される。

また、本発明のフィルタの一実施形態では、毛管作用により血液サンプルを流路内に導入することもでき、その場合、従来のフィルタ材を使用したものののように、サンプル液を流すためにシリンジなどで圧力をかける必要もない。

また、従来のフィルタ材を使用した場合、繊維などによってできる孔の大きさは正確に決定できない（平均値としてしか把握できない）が、本発明のフィルタでは、スリットの大きさが正確に決定し得るため、スリット幅を適切に調節することによって、異なるサイズの分子の中から所望のサイズのものを比較的容易に選別することが可能である。

また、本発明のフィルタおよびそのようなフィルタを組み込んだバイオセンサは、半導体加工技術を利用して作製することにより、大量の均質な装置をまとめて作製することができる。

典型的には、本発明により、幅 5 mm、長さ 9 mm、高さ 2.5 mm 程度の極小のフィルタ組込型バイオセンサが提供され、このバイオセンサにより、30 nL 程度の極微量の血液を血漿と血球とに分離し、血漿中のグルコース濃度などを測定することが可能となる。しかしながら、本発明の技術的範囲は、このような実施形態に限定されない。

図面の簡単な説明

図 1 A は、本発明の一実施形態に係る、血液中の血球と血漿とを分離する血液成分分離フィルタ 1 の模式的な上面

図であり、図 1 B は、その斜視図である。

図 2 A は、本発明の一実施形態に係る血液成分分離フィルタ 1 を図 1 B 中に示した切断線に沿って切断した断面の斜視図であり、図 2 B は、図 2 A に示すフィルタ 1 の流路内部の拡大上面図である。

図 3 A、図 3 B、および図 3 C は、柱状構造物 1 9 およびそれらの配置のバリエーションを示す模式図である。

図 4 A は、採取した血液から血球を分離するためのフィルタと、血糖値のような検査項目の分析のためのバイオセンサとが一体化した本発明のバイオセンサ 2 の構成を示す模式的な上面図であり、図 4 B はその斜視図である。

図 5 A は、本発明のフィルタ 1 により血液を濾過したときの試料導入前の状態を示す図であり、図 5 B は、試料導入後の状態を示す図である。

図 6 は、本発明のバイオセンサ 2 によるグルコースの応答値変化を示す図である。

図 7 は、本発明のバイオセンサ 2 によるコレステロールの応答値変化を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

図 1 は、本発明の一実施形態に係る、血液中の血球と血漿とを分離する血液成分分離フィルタ 1 の模式的な上面図（図 1 A）および斜視図（図 1 B）である。

図 1 A および図 1 B を参照して、本発明の血液成分分離フィルタ 1 は、基板 1 1 とカバー 1 2 とを含む。基板 1 1 上には流路用の溝が予め形成されており、カバー 1 2 が張

り合わされることによって、流路 18 と、流路 18 の両端の試料導入口 14 および試料排出口 15 とが規定される。フィルタ 1 はさらに、流路 18 上に血球を塞ぎ止めるための複数の構造物 19 を備える。

この実施形態では、微細な構造物 19 がフィルタ流路 18 内に複数並べられている。構造物 19 の形状は、好ましくは柱状であり、最も好ましくは円柱状である。これらの構造物 19 は、血球を通過させないように、互いに適切な間隔をおいて流路 18 内に配置される。典型的には、このような柱状構造物 19 は、基板 11 を反応性イオンエッチングなどの半導体加工技術により加工することによって作製することができる。このように構成されたフィルタ 1 に血液サンプルを通すことにより、血液中の血漿と血球とを分離することができる。なお、上記の例では、基板 11 をエッチングにより彫り込むことによって流路 18 および構造物 19 を形成したが、構造物 19 のみをエッチングにより作製した基板 11 の両脇にスペーサを配置し、その上にカバー 12 を張り合わせることによって流路 18 を形成してもよい。

図 1 に示すように、フィルタ 1 において、流路 18 上の柱状構造物 19 が形成された部分であるフィルタ領域 110 をはさんで両側（試料導入口側および試料排出口側）にそれぞれ、血球を含む血液用の液溜 16 および血漿用の液溜 17 が規定される。

本発明の血液成分分離フィルタ 1 の好適な実施形態では、ヘマトクリット値が 40 から 60 である血液を試料とし

て用い、その試料を毛管現象により試料導入口 14 から流路 18 内へ導入する。なお、ヘマトクリット値とは、血球が血液のなかで占める容積の割合を示し、通常は赤血球の容積の割合を示す。導入された血液成分のうち、血球は多数形成させた柱状構造物 19 で塞ぎ止められ、残りの血漿が試料排出口 15 側の血漿用の液溜 17 へと通過する。このようにして、シリンジポンプなどを使用せずに、簡単に血液中の血球を血漿成分から分離することができる。なお、血液導入時、及び導入後の血球は溶血されていない。

図 2 A は、本発明の一実施形態に係る血液成分分離フィルタ 1 を図 1 B 中に示した切断線に沿って切断した断面の斜視図である。但し、図 2 A では、見やすさのために、カバー 12 を基板 11 から離して示し、さらに柱状構造物 19 の数や配置は簡略化している。図中の矢印は試料が進入する方向を示す。

図 2 B は、図 2 A に示すフィルタ 1 の流路内部の拡大上面図である。矢印は試料が進入する方向を示す。図 2 B に示すように、1 つの柱状構造物 19 は、隣り合う他の柱状構造物との間でスリット 101、および流路 18 の内壁との間でスリット 103 を規定する。

構造物 19 は、血漿成分のみ通過させ、血球を通過させないために、スリット 101 およびスリット 103 が最適な幅になるように、流路 18 内に配置される。構造物 19 はさらに、図示されるように、流路 18 の内壁とともに血球を収容するための血球溜として機能するキャビティ 104 を流路 18 内に形成するように、折り返し部分を有して

流路 18 内に配置される。以下、これらの構成について、さらに詳しく説明する。

以下の説明では、1つの柱状構造物と隣り合う他の柱状構造物との間で規定されるスリット 101 の幅を α とし、柱状構造物 19 と隣接する流路 18 の内壁との間で規定されるスリット 103 の幅を、 γ と定義する。また、柱状構造物 19 と流路 18 の内壁から形成されるキャビティ 104 の入口 102 の幅を、 β と定義する。

まず、幅 α は、本発明のフィルタ 1 に、血球を塞き止めるが血漿成分は通過させるフィルタとしての機能を付与させるように設定される。赤血球は扁平なディスク形状を有しており、その平均的な厚さは約 $2\ \mu\text{m}$ 、そして直径が約 $8\ \mu\text{m}$ 程度である。また、白血球は、直径が約 $6\sim 25\ \mu\text{m}$ の不定形の球状分子である。したがって、血球を塞き止め、血漿が流れやすくするには、約 $2\ \mu\text{m}$ 以下にすることが好ましい。また、 α を約 $0.1\ \mu\text{m}$ より小さくすると、液体の表面張力などの作用により、血漿成分でさえもスリット 102 を通過しにくくなってしまうため、 α は約 $0.1\ \mu\text{m}$ 以上とすることが好ましい。これらを実際に試験した結果を、表 1 に示す。

(表 1)

柱状構造物 間隔 (α)	8	4	2.2	2.0	1.8	1.6	1	0.3	0.1	0.05
血球塞き止め	×	×	×	○	○	○	○	○	○	△

数値の単位： μm

シンボルの説明：○：血球の塞き止めを確認。×：血球の塞き止めを確認

認できず。△：血球および液成分の両方が塞き止められる。

なお、キャビティ104の入口の幅 β を $10\mu\text{m}$ 、キャビティ104の入口の高さを $9\mu\text{m}$ 、柱状構造物の断面を $2\mu\text{m}\times 2\mu\text{m}$ の正方形とした。

α についてのこれらの最適値は、柱状構造物19と流路18内壁との間の幅 γ についても同様に当てはまる。柱状構造物間のスリット101の幅 α および柱状構造物と流路の内壁との間のスリット103の幅 γ を、上記のように設定することにより、血漿は通過するが血球は通過さない、血球分離フィルタが作製され得る。

しかしながら、上記のようにスリットの幅を設定したとしても、スリット101およびスリット103には、血液サンプルを流すにつれて血球が進入し「目詰まり」が発生する。目詰まりが発生すると、血漿でさえフィルタを通過し得なくなるため、血漿の分離効率が低下する。本発明のフィルタ1では、この現象を緩和するために、柱状構造物の配置を、図1および図2に示すように流路内の限られたスペース内で折り返し構造とした。

柱状構造物19を、流路18内で折り返しに配置することにより、柱状構造物19を流路18内で直線的に並べた場合に比べて、血漿成分が通過するスリットの数を増加させることができる。さらに、流路18内壁と柱状構造物19の配列とによって、流路18内にキャビティ104が形成され、このキャビティ104が、血球を収容する血球溜の役割を果たし、試料導入口側の液溜め16に血球が蓄積することを緩和することができる。結果として、スリット

の目詰まりを抑制し、濾過効率を増大させ得る。

このようにして、短時間でより多くの血漿成分がスリットを通過することができ、デバイスサイズを大きくすることなく、効率的に血液成分の分離を行うことができる。

構造物 19 の折り返し構造と流路 18 の内壁とによってできるキャビティ 104 の入口 102 の幅 β は、赤血球の厚さが約 $2\ \mu\text{m}$ であることを考えると、約 $2\ \mu\text{m}$ 以上に設定することが好ましい。幅 β が小さすぎると、赤血球が入口 102 を通過し得なくなってしまう。なお、赤血球の厚さは、性差や個人差があるため、最適な β の最小値は、目的に応じて変化し得る。

また、幅 β を大きくすればする程、キャビティ内部に留まる液成分の割合が大きくなるため液成分の回収率を低下させてしまうことから、幅 β は大きすぎない方が効率的である。最適な β の最大値は、目的に応じて当業者が適宜決定し得るが、血球がキャビティ 104 内に一列に並ぶような状態が最も良好な血球分離効率を与えるため（データ示さず）、幅 β は、赤血球の直径とほぼ同じ大きさである $10\ \mu\text{m}$ 程度またはそれ以下であることが好ましい。幅 β の最大値は、約 $8\ \mu\text{m}$ 以下であることが最も好ましい。

したがって、 β は、約 $2\ \mu\text{m}$ 以上約 $10\ \mu\text{m}$ 以下であることが好ましく、約 $2\ \mu\text{m}$ 以上約 $8\ \mu\text{m}$ 以下であることが最も好ましい。しかしながら、最適な β の最大値は、目的に応じて当業者が適宜決定し得る。

キャビティ 104 の深さ（または奥行き）は大きいほど、血漿の濾過効率は良いが、キャビティ 104 の大きさは

、フィルタ 1 本体または流路 18 の大きさによって必然的に限定されるため、所望のフィルタのサイズに応じて、適宜最適な奥行きを決定する。典型的には、例えば、10 mm 程度の長さのチップ（フィルタ本体）に対して、2 mm 程度の深さのキャビティを作製することが可能であるが、これに限定されない。

キャビティ 104 の形状は、典型的には、図 1 または図 2 に示されるようなほぼ直方体の形状であるが、これに限定されない。図 3 は、柱状構造物 19 およびそれらの配置のバリエーションを示す模式図である。図 3 A ～ 図 3 C は、それぞれキャビティ 104 部分を上から見たものである。図 3 中の矢印は、サンプル液の流れる方向を示す。

図 3 A は、図 1 および図 2 に示すものと同様のほぼ直方体の形状をしたキャビティを示すが、各柱状構造物の断面が円形である（各構造物が円柱状である）点で、図 1 および図 2 に示すものとは異なる。

図 3 B および図 3 C は、図 3 A と同様に円柱状の構造物 19 を折り返しに配置したものであるが、配置の形状が図 3 A のものとは異なる。図 3 B に示すようにキャビティの入口をオープン形状にすると、血球がキャビティ内に入り込みやすく、また入口付近での血球の滞留を防止することに役立つ。図 3 C は、キャビティの入口の形状は、図 1、図 2、および図 3 A に示すものと同様であるが、キャビティの底部が円形になっている点で異なる。

このようにキャビティの形状としては、様々なものが可能であり、ここに例示したもの限定されない。

濾過効率は、流路 18 の限られた空間内で構造物 19 の配列の折り返し回数を多くすることにより、さらに向上させることができる。典型的には、流路幅を 1.5 mm とすると、幅 10 μ m のほぼ直方体のキャピティを 10 μ m 間隔で 750 回繰り返した配置をとることができるが、これより多く繰り返してもよいし、少なくともよい。

また、幅 α 、 β および γ は、被験者の血球のサイズによっても変化させてもよい。例えば、通常、男性と女性とでは、赤血球のサイズが異なる（女性の赤血球のほうがより小さい）ため、女性の血液サンプルを使用する場合には、上記の代表的な値より小さいものを使用することもできる。

本発明のフィルタを用いる濾過に必要なサンプル量は、流路の深さ、構造物の配置などに依存して変化し得るため、当業者はフィルタの大きさなどにより適宜最適な量を決定し得る。本発明のフィルタでは、従来技術にみられたようなフィルタ材による吸収はない。また、本発明のフィルタでは、血球移動遅延の効果で濾過を行っているのではないことから、フィルタのサイズを小さくすることができる。したがって、サンプル量を従来よりも少量にすることが可能である。

本発明のフィルタの濾過効率は、柱状構造物の配置、キャピティの形状、キャピティ内部の容積などに依存するため、これらを適宜最適化することが必要である。

柱状構造物は断面形状が四角や丸等、どのような形状であっても構わない。しかしながら、赤血球膜の破壊（溶血

）をできるだけ防止するためには、柱状構造物は滑らかな表面を有する（例えば、断面が円形である）ことが好ましい。

柱状構造物および流路の内壁は、シリコーン樹脂、テフロン、エポキシ樹脂などの、血液が凝固しにくい材料で構成されるか、またはそのような材料で表面が被覆されていることが好ましい。あるいは、血液の凝固を促進するCaの含有量が少ない、SiO₂などの純度の高いガラス層を用いて作製され得る。

流路18内部またはキャビティ104内部の高さ（または、厚さ）は、任意であり得るが、現在の製造技術のレベルを考慮すると、100μm程度以下であることが現実的である。しかしながら、技術水準の変化に応じて、それ以上の厚さ（高さ）もあり得る。

また、本発明のフィルタは、半導体加工技術で基板上に作製したものに限定されず、例えば、プラスチック成型技術などでも同様に作製し得る。

本発明はまた、上記のようなフィルタを備えたバイオセンサを提供する。

図4は、採取した血液から血球を分離するためのフィルタと、血糖値のような検査項目の分析のためのバイオセンサとが一体化した本発明のバイオセンサ2の構成を示す。図4Aは、バイオセンサ2の模式的な上面図であり、図4Bは、その斜視図である。

図4Aおよび図4Bを参照して、本発明のフィルタ一体型バイオセンサ2は、基板21と、基板21に重ね合わさ

れたカバー 2 2 と、基板 2 1 とカバー 2 2 とによって規定される流路 2 8 とを備えている。バイオセンサ 2 はさらに、上記流路 2 8 の一端に形成された試料を導入するための試料導入口 2 4 と、他端に形成された流路から空気を逃がすための空気逃がし口 2 5 とを備える。

バイオセンサ 2 はさらに、流路 2 8 上に形成された、複数の柱状構造物 2 9 を備えるフィルタ領域 2 1 0と、そのフィルタ領域 2 1 0 の上流に血球成分を含む血液サンプルが滞留するための液溜 2 6と、そのフィルタ領域 2 1 0 の下流に作用極 2 0 5、対極 2 0 6、および反応領域 2 1 1 に試料が到達したことを検出するための液導入検知電極 2 1 2を収容した反応領域 2 1 1 とを備え、さらに上記フィルタ領域 2 1 0 と上記反応領域 2 1 1 との間に、それらを連結する試料導入路 2 7 とを備える。作用極 2 0 5 上には、酵素（例えば、グルコースオキシダーゼ）およびメディエータ（例えば、シアン化鉄イオンのような金属錯体）を含む試薬 2 0 7 が配置されている。上記流路 2 8 および柱状構造物 2 9 は、反応性イオンエッチングのような半導体加工技術を用いることにより、基板 2 1 上に形成し得る。

バイオセンサ 2 はさらに、作用極 2 0 5 と一体的に連結したリード 2 0 8、対極 2 0 6 と一体的に連結したリード 2 0 9、および液導入検知電極 2 1 2 と一体的に連結したリード 2 1 3 を備える。これらの電極（2 0 5、2 0 6、2 1 2）およびリード（2 0 8、2 0 9、2 1 3）は、カバー 2 2 の基板 2 1 と対向する面上に、スパッタ蒸着などの方法により形成され得る。

このように構成された本発明のフィルタ一体型バイオセンサ 2 は、フィルタを備えていない従来のバイオセンサと同様のサイズにすることが可能であり、微量サンプル量で、正確に、短時間に、血糖値などの分析が可能である。

以下、実施例を用いて、本発明をより具体的に説明するが、本発明の範囲は、これらの実施例に限定されない。

(実施例 1)

・ 作製したフィルタを用いた血液成分の分離

本発明に基づくフィルタをシリコン基板上に作製し、血液成分の分離を観察した。以下、図 1 および図 2 を参照して説明する。

5 mm × 9 mm × 0.5 mm の大きさのシリコン基板 11 を用いて、反応性イオンエッチングにより、流路 18、および複数の柱状構造物 19 を上記基板 11 のほぼ中央に複数の折り返し部分を有するように構築した。さらに、柱状構造物 19 およびシリコン基板 11 の表面に、熱酸化により酸化被膜（図示せず）を形成した。この基板 11 上に、シリコン樹脂製のカバー 12 を密着して張り合わせるにより、本発明のフィルタ 1 を作製した。

このようにして作製したフィルタ 1 は、流路 18 の幅 1.5 mm、高さ 30 μ m、長さ 9 mm を有していた。また、多数の柱状構造物 19 の折り返しと流路 18 内壁とによってできるキャピティ 104 は、ほぼ直方体の形状であり、その深さ（奥行き）は 2 mm、キャピティ入口の幅 β は 10 μ m であった。また、柱状構造物 19 の各々は、2 μ m × 2 μ m の正方形の断面を有し、4 μ m のピッチで 2 μ

mの幅のスリット 1 0 1 および 1 0 3 を形成するように配置された。また、折り返しは、 $20\mu\text{m}$ のピッチで流路の長手方向に対して垂直方向に 7 5 0 回繰り返された。

なお、上記酸化被膜の形成には、熱酸化による方法以外に、減圧 C V D (化学的気相成長)、プラズマ C V D、常圧 C V D などを使用し得る。

上記のように作製された本発明の一実施形態に係る血液成分分離フィルタ 1 の評価手順は、以下の通りであった。最初に、作製したフィルタ 1 を顕微鏡のステージに載せ、そのフィルタ 1 の流路の一端にある試料導入口 1 4 に試料としての血液を滴下し、液体の流れを顕微鏡ビデオ撮影によって記録した。液体が移動する様子を図 5 に示す。

図 5 A は、試料導入前のフィルタ 1 の様子を示す。図 5 B は、試料導入後のフィルタ 1 の様子を示す。図 5 の写真において、矢印は血液が移動する方向を示す。それぞれの写真は、左側の黒い部分がフィルタ領域 1 1 0、右側の明るい部分がフィルタ領域 1 1 0 を通過したサンプルの液溜 1 7 を示している。血液は毛管現象により写真の左から右へと移動する。

血液が試料導入口 1 4 から導入されると同時にフィルタ 1 の試料導入口 1 4 側の液溜 1 6 に血液が充填され、続けてフィルタ領域 1 1 0 内に充填された。

図 5 B に示すように、試料導入後、ろ過された透明な血漿はフィルタ領域 1 1 0 から下流側の液溜 1 7 へと流れ出した。写真の明るい部分に見える境界線は、血液から血球が分離され、血漿のみを含むサンプル液の最前線の境界で

ある。血液導入から血漿ろ過完了までに要した時間は、平均してわずか25秒以内であった。このようにして効率的に血液中の血球と血漿を分離する事が可能となった。

(実施例2)

・本発明のバイオセンサ2の作製

図4Aおよび図4Bを参照して説明する。基板21は、信越シリコン社製シリコン基板(P型、100面、直径100mm、厚さ525 μ m、抵抗率10~20 $\Omega \cdot \text{cm}$)を使用した。その基板21上に、反応性イオンエッチングなどの半導体加工技術によって、流路28、および複数の柱状構造物29を多数の折り返しを有するような配置において作製した。次に、シリコン基板21表面に熱酸化することによって絶縁膜を成膜した。

他方、樹脂製シートからなるカバー22の一方の面上に作用極205、対極206、および液導入検知電極212、ならびにリード208、209および213をスパッタ蒸着することによって作製した。次いで、作用極205上に、試薬207としてグルコースオキシダーゼおよびメディエータ(例えば、シアン化鉄イオンのような金属錯体)をシリンジによるディスペンス法により配置した。このカバー22を、上記電極(205, 206, 212)が形成された面が対向するように基板21に加圧熱圧着によって貼り合わせた。これにより、試料用流路28、その流路の一端に試料導入用の試料導入口24、他端に空気を逃がすための空気抜き口25が規定される。

上記電極(205, 206, 212)および試薬20

7 が配置された領域（反応領域）2 1 1 内で血漿内の測定対象物が測定される。具体的には、作用極 2 0 5 上に設けた試薬 2 0 7 が血液導入とともに融解して、試薬 2 0 7 中の酵素が血液中のグルコースと反応する。作用極 2 0 5 と対極 2 0 6 間に 0 . 5 V の電圧を印加して、これらの電極間に流れる電流を計測して、所定の時間（例えば 3 0 秒）経過後の電流値からグルコース値を算出する。

上記方法で得られたバイオセンサ 2 は、長さ 1 1 m m、幅 5 m m、高さ 2 . 5 m m であり、流路 2 8 のサイズは幅 1 . 5 m m、長さ 7 . 0 m m、高さ 3 0 μ m である。必要とされるサンプル量は 3 1 . 5 n l 未満となる。このように、本発明によれば、サンプル量が従来の血液成分分離フィルタを用いる場合より少なくなるフィルタ一体型バイオセンサ 2 が提供される。

（実施例 3）

・グルコース濃度の測定

図 6 は血液中のグルコース濃度 8 7 ~ 6 4 8 m g / d l におけるバイオセンサ感度を比較したものである。同図において黒三角は標準液を、黒四角は本発明のフィルタ一体型バイオセンサ 2 での、黒菱形は比較例としてフィルタを備えていないバイオセンサでの計測データを示す。

グルコース濃度の異なる血液の調製は、血液（ヘマトクリット値：4 4）にグルコース溶液を、8 7 ~ 6 4 8 m g / d l の範囲で添加することで行った。標準液は、リン酸緩衝生理食塩水にグルコースを溶解したものを使用した。

バイオセンサ 2 は、実施例 2 に示すように作製した。また、比較例のフィルタを備えていないバイオセンサは、必要とされるサンプル量 600 n l のものを使用した。

電流値は試料導入口 2 4 から血液を導入し、2 5 秒後に作用極 2 0 5 のリード 2 0 8 と対極 2 0 6 のリード 2 0 9 に 0 . 5 V の電圧を印加した。その 5 秒後に計測を行った。

フィルタありの本発明のデバイス 2 での応答は、フィルタなしのデバイスの応答よりも約 2 0 パーセント応答値が上昇し、グルコース標準液の応答値により近づいた。このことから感度が向上した事が分かる。

(実施例 4)

・ コレステロール濃度の測定

図 7 は血液中のコレステロール濃度 1 1 3 ~ 2 8 8 m g / d l におけるバイオセンサ応答を比較したものである。同図において黒菱形は本発明のフィルター体型バイオセンサ 2 であり、黒四角は比較例としてのフィルタを備えていないバイオセンサである。

コレステロールの異なる血液は、全血を遠心分離で血漿を取り除いた後、高コレステロール値をもつ標準血清（セラクリアー L P 異常域、アズウェル製）を添加することで作製した。なお、本実施の形態では試薬としてコレステロールエステラーゼを用いた。

図 7 に示されるように、フィルタを付けていないバイオセンサでは血球が妨害物質として作用し、コレステロール濃度に比例した電流値が得られず、測定不能となったが、

フィルタを付けたバイオセンサ 2 の場合は、コレステロール濃度に依存した値が測定された。このことからフィルタ付のデバイス 2 を使用することにより、はじめて正確な測定が可能となった事が分かる。

なお、実施例 3 および 4 において、酵素電極方式に基づく測定を例示したが、測定手段が酵素電極方式以外のものを用いても良い。そのような一例として、酵素比色方式がある。

産業上の利用可能性

このように、本発明に係る血球と血漿の分離フィルタは、バイオセンサや DNA 診断等の臨床検査の前処理デバイスとして有用である。

請求の範囲

1. 血球成分を含む血液試料を濾過するためのフィルタであって、

前記血液試料を流すための流路と、

前記流路の一端に前記血液試料を導入するための開口部と、

前記流路の他端に濾過された前記血液試料を排出するための開口部とを備え、

前記流路内には血球成分の通過を妨げるように複数の構造物が配置されており、

前記構造物の各々は、隣接する流路の内壁または隣接する他の構造物との間で血球成分が通過できないようなスリットを形成するように間隔をおいて配置され、

前記複数の構造物および前記流路の内壁は、血球成分を収容するための血球溜として機能するキャビティを少なくとも1つ前記流路内に規定する、フィルタ。

2. 前記キャビティが少なくとも2つ前記流路内に規定されている、請求項1に記載のフィルタ。

3. 前記キャビティの奥行きは、前記キャビティの開口部の幅よりも大きい、請求項1に記載のフィルタ。

4. 前記キャビティの開口部の幅は、約2 μm ~ 約10 μm の範囲である、請求項1に記載のフィルタ。

5. 前記キャビティの形状は、ほぼ直方体である、請求項1に記載のフィルタ。

6. 前記スリットの幅は、約0.1 μm ~ 約2 μm の範囲

である、請求項 1 に記載のフィルタ。

7. 前記流路は、基板と、スペーサと、当該スペーサを介して当該基板に張り合わされるカバーとから形成される、請求項 1 に記載のフィルタ。

8. 前記構造物は、柱状の形状を有する、請求項 1 に記載のフィルタ。

9. 前記構造物は、円柱状の形状を有する、請求項 8 に記載のフィルタ。

10. 前記血液試料は、毛管作用により前記流路内に導入される、請求項 1 に記載のフィルタ。

11. 前記構造物および前記流路の内壁は、シリコーン樹脂、テフロン、もしくはエポキシ樹脂で構成されているか、またはこれらのいずれかで表面が被覆されている、請求項 1 に記載のフィルタ。

12. 血球成分を含む血液試料を濾過するためのフィルタ領域を備えたバイオセンサであって、

基板と、

前記基板に支持された測定系と、

前記測定系またはその近傍の前記基板上に支持された酸化還元酵素を含む試薬系と、

前記基板と組み合わされるカバーであって、それにより前記基板との間に、前記血液試料から血球成分を除去するためのフィルタ領域と、前記測定系および前記試薬系を収容する反応領域と、前記フィルタ領域と連結し前記反応領域に試料を導入するための試料導入路とを規定する、カバーとを含み、

前記フィルタ領域は、

前記血液試料を流すための流路と、

前記流路の一端に前記血液試料を導入するための開口部と、

前記流路の他端に濾過された前記血液試料を排出するための開口部であって、前記試料導入路と連結した開口部と、

前記流路内に血球成分の通過を妨げるように配置された複数の構造物とによって規定され、

前記構造物の各々は、隣接する流路の内壁または隣接する他の構造物との間で血球成分が通過できないようなスリットを形成するように間隔をおいて配置され、

前記複数の構造物および前記流路の内壁は、血球成分を収容するための血球溜として機能するキャビティを少なくとも1つ前記流路内に規定する、バイオセンサ。

13. 前記測定系に、少なくとも一対の電極を含む電極系を含む、請求項12に記載のバイオセンサ。

14. 前記キャビティが少なくとも2つ前記流路内に規定されている、請求項12に記載のバイオセンサ。

15. 前記キャビティの奥行きは、前記キャビティの開口部の幅よりも大きい、請求項12に記載のバイオセンサ。

16. 前記キャビティの開口部の幅は、約2 μm ~ 約10 μm の範囲である、請求項12に記載のバイオセンサ。

17. 前記キャビティの形状は、ほぼ直方体である、請求項12に記載のバイオセンサ。

18. 前記スリットの幅は、約0.1 μm ~ 約2 μm の範

図である、請求項 1 2 に記載のバイオセンサ。

19. 前記流路は、基板と、スペーサと、当該スペーサを介して当該基板に張り合わされるカバーとから形成される、請求項 1 2 に記載のバイオセンサ。

20. 前記構造物は、柱状の形状を有する、請求項 1 2 に記載のバイオセンサ。

21. 前記構造物は、円柱状の形状を有する、請求項 20 に記載のバイオセンサ。

22. 前記血液試料は、毛管作用により前記流路内に導入される、請求項 1 2 に記載のバイオセンサ。

23. 前記構造物および前記流路の内壁は、シリコーン樹脂、テフロン、もしくはエポキシ樹脂で構成されているか、またはこれらのいずれかで表面が被覆されている、請求項 1 2 に記載のバイオセンサ。

要約書

本発明は、血球成分を含む血液試料を濾過するためのフィルタであって、前記血液試料を流すための流路と、前記流路の一端に前記血液試料を導入するための開口部と、前記流路の他端に濾過された前記血液試料を排出するための開口部とを規定し、血球成分の通過を妨げるように配置された複数の構造物を前記流路内に備える本体を含み、前記構造物の各々は、隣接する流路の内壁または隣接する他の構造物との間で血球成分が通過できないようなスリットを形成するように間隔をおいて配置され、前記複数の構造物および前記流路の内壁は、血球成分を収容するための血球溜として機能するキャビティを少なくとも1つ前記流路内に規定する、フィルタに関する。

図 1 A

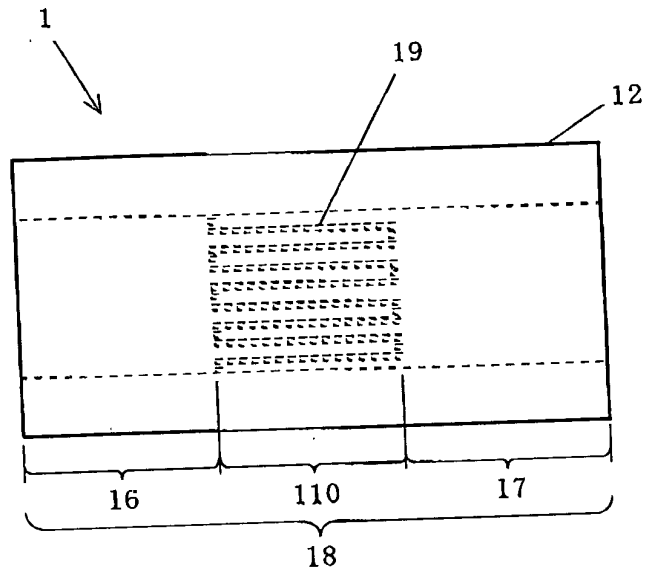


図 1 B

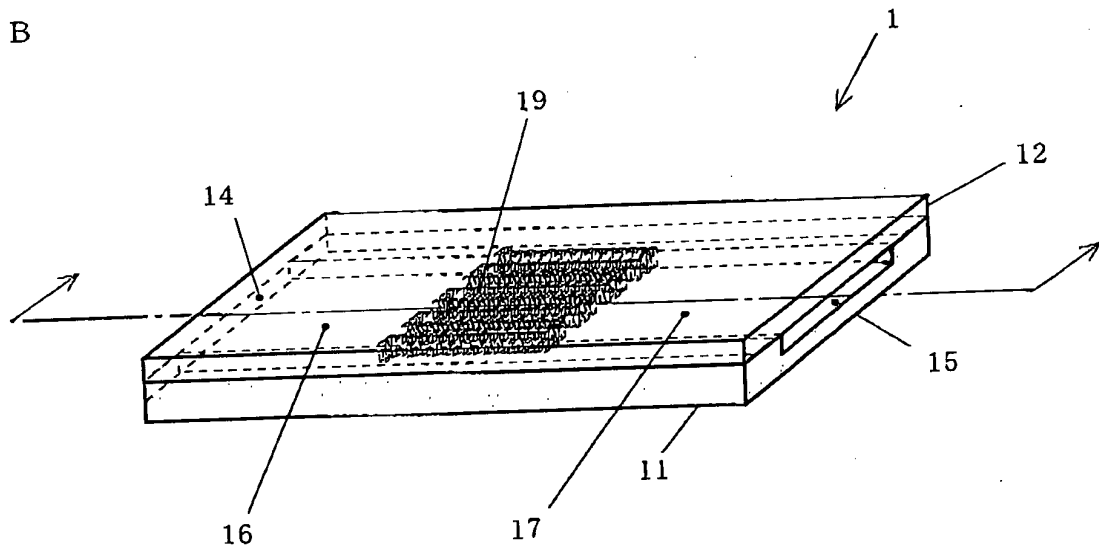


図 2 A

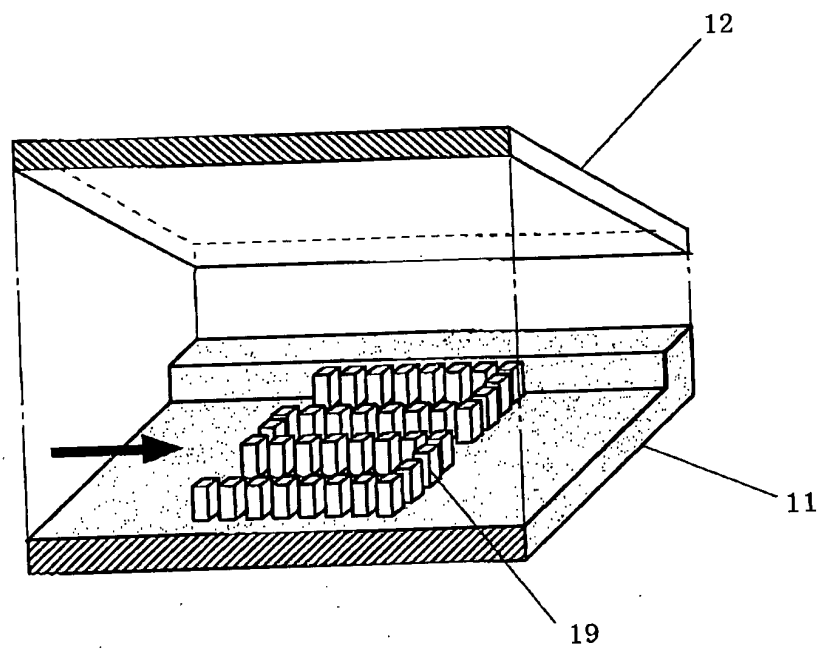


図 2 B

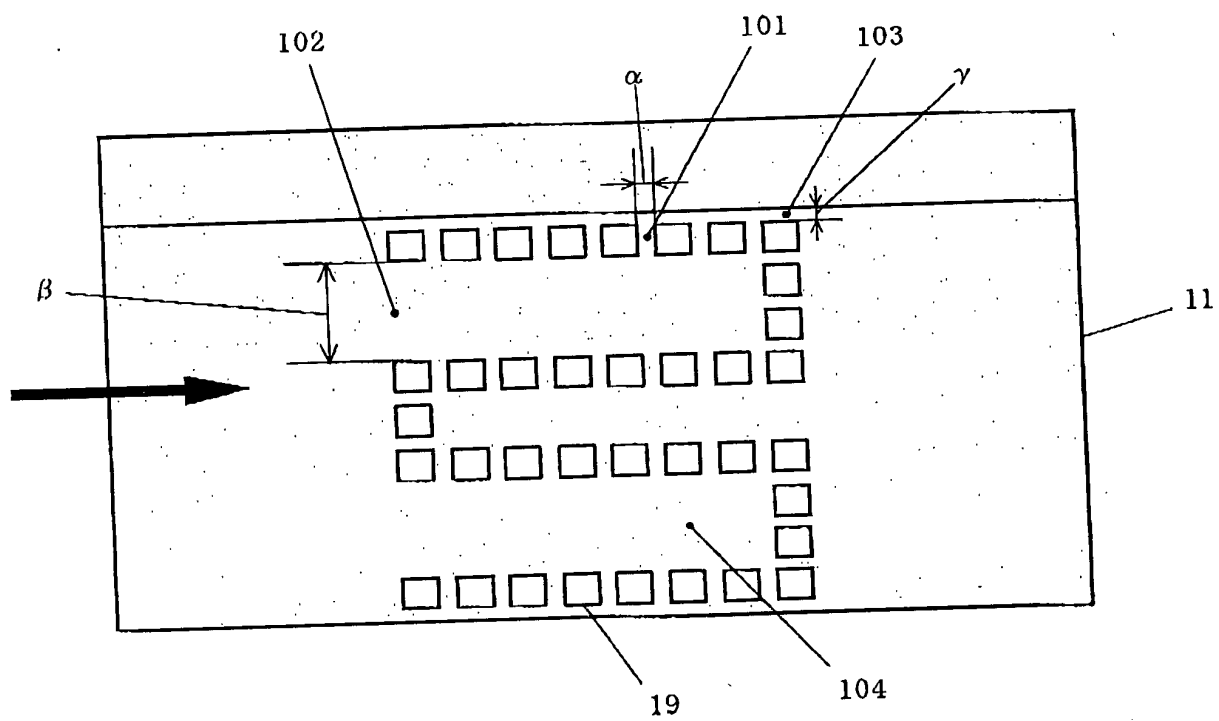


図 3 A

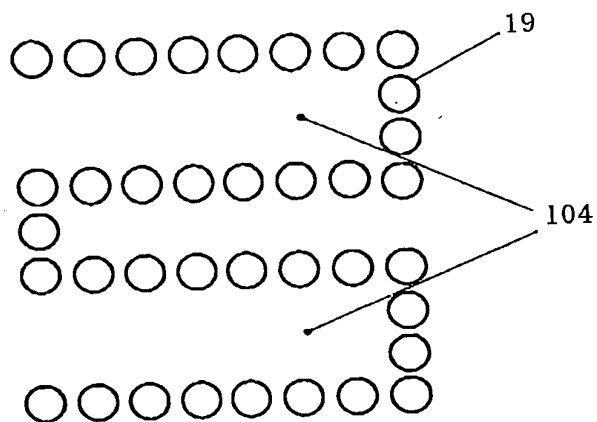


図 3 B

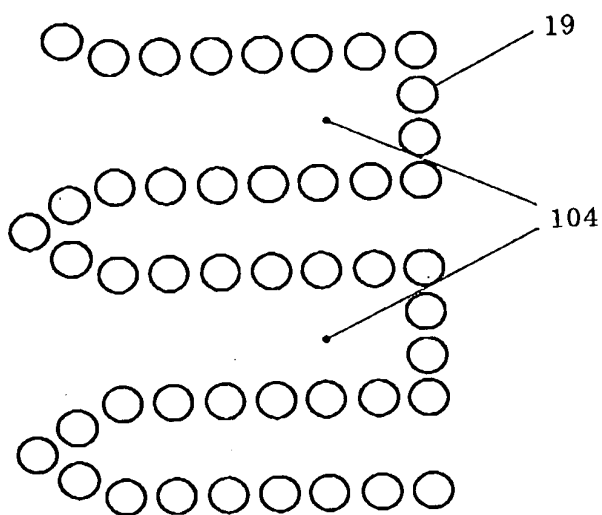


図 3 C

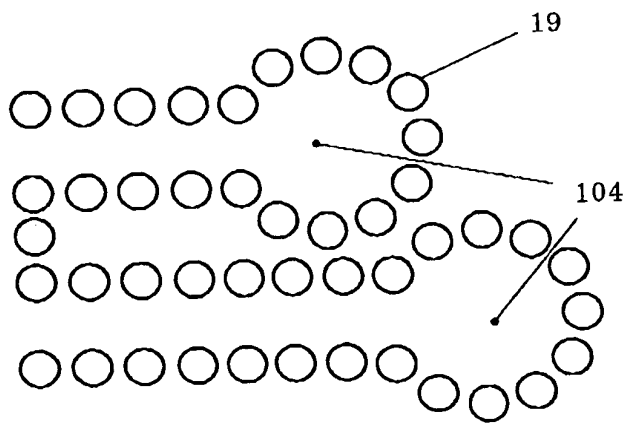


図 4 A

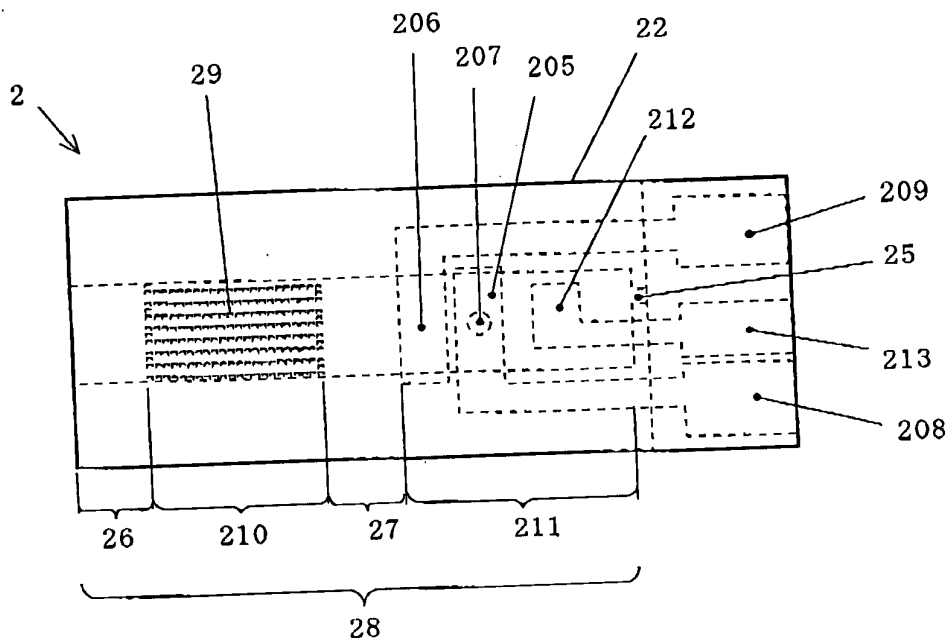


図 4 B

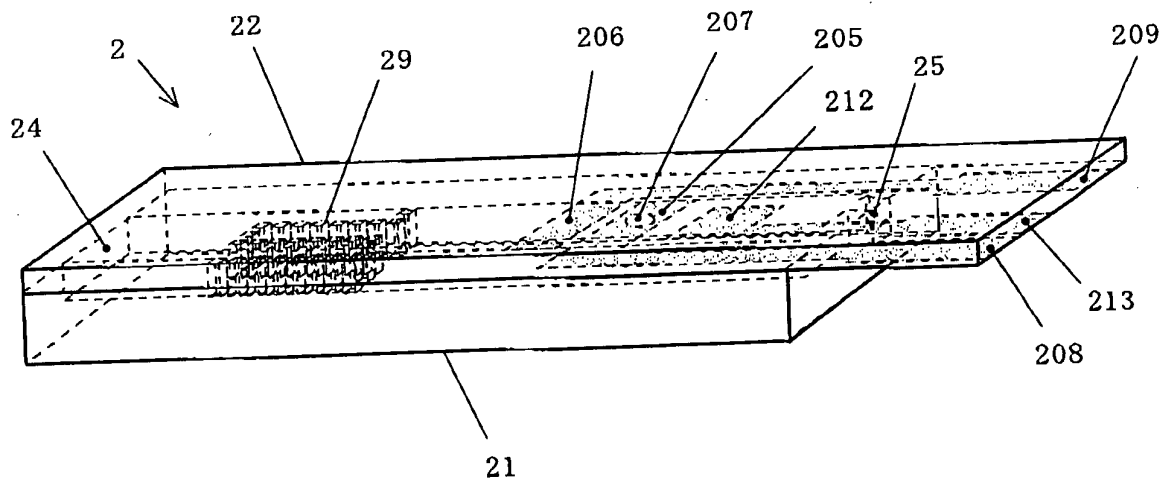


図 5 B

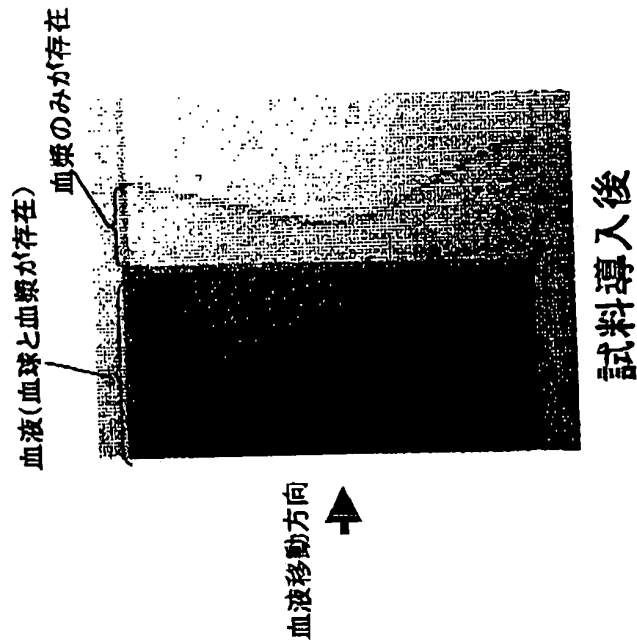


図 5 A

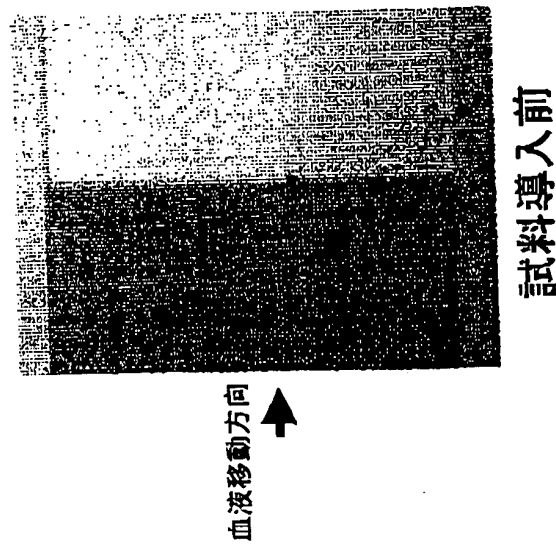


図 6

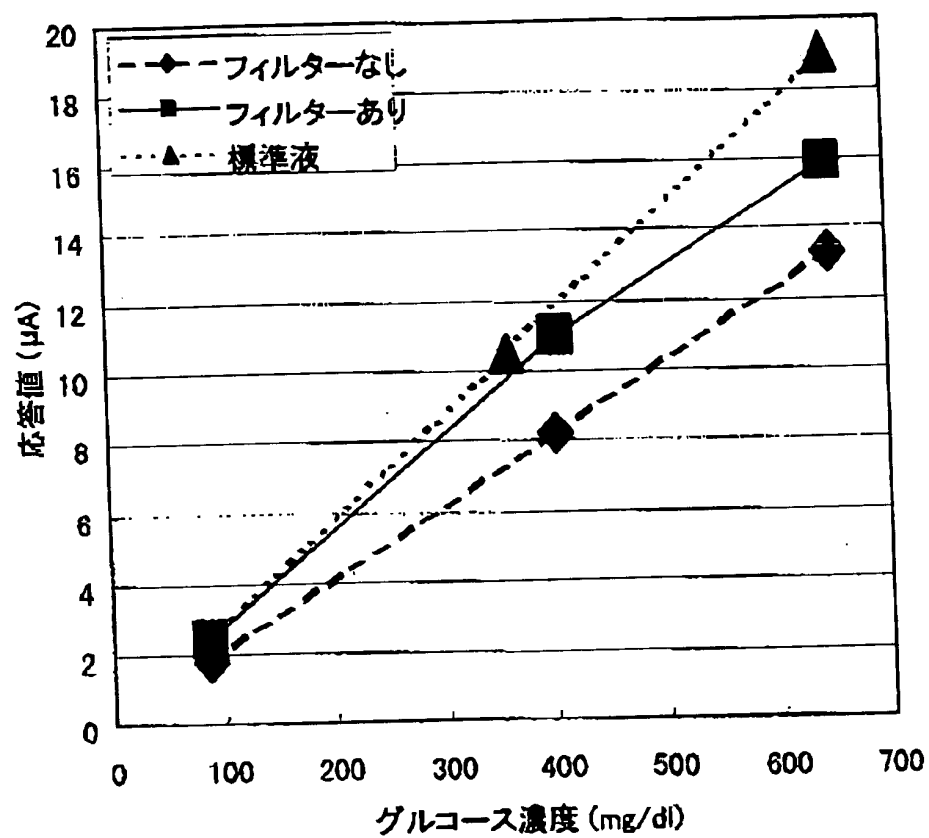
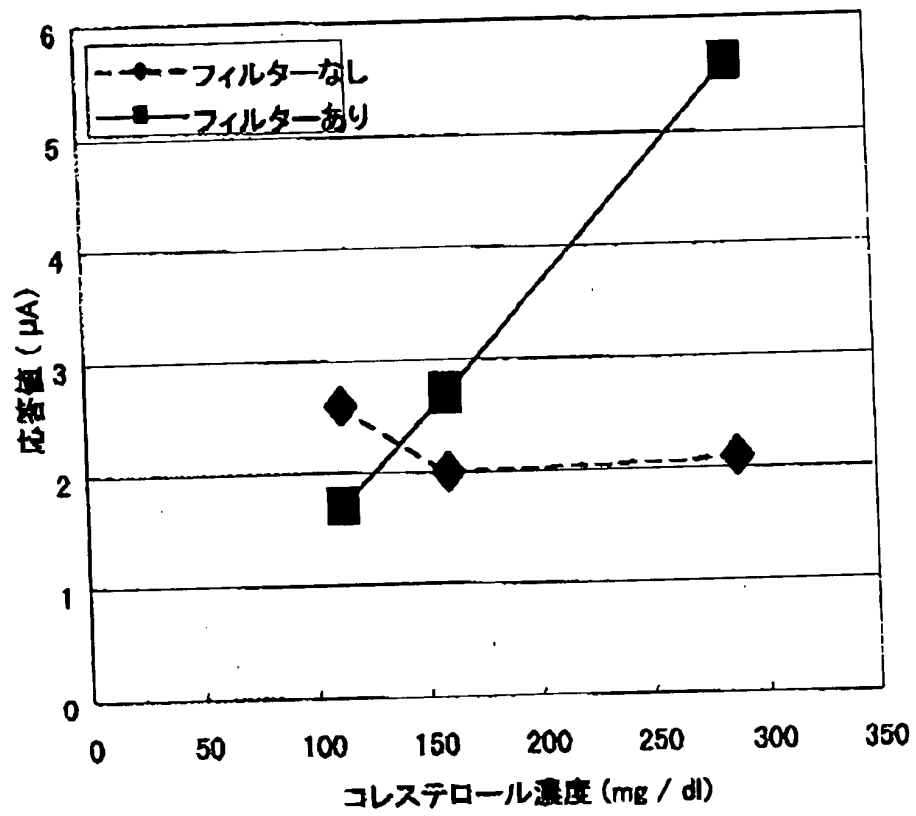


図 7



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.